

CELL CULTURE CONTAINER**Publication number:** JP2002218967**Publication date:** 2002-08-06**Inventor:** ONO TADAO; KAWAMURA KENJI**Applicant:** RIKAGAKU KENKYUSHO; ONO TADAO; SUMITOMO
BAKELITE CO**Classification:****- International:** *C12M3/06*; C12M3/06; (IPC1-7): C12M3/06**- European:****Application number:** JP20010016626 20010125**Priority number(s):** JP20010016626 20010125**Report a data error here****Abstract of JP2002218967**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a cell culture container in which even a floating cell is hardly removed simply in an exchange of culture solutions even in a cultured state by a container having a great number of culture wells such as 96 well plates for animal cell culture, even after freezing and melting of an adherent cell of anchorage dependency, the adherent cell is not simply made into a suspension state and made into a state to rapidly recover a cell function. **SOLUTION:** This cell culture container holds a cultured cell in a culture container by a porous structure through which a culture solution is passed.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-218967
(P2002-218967A)

(43) 公開日 平成14年8月6日 (2002.8.6)

(51) Int.Cl.⁷
C 1 2 M 3/06

識別記号

F I
C 1 2 M 3/06

データベース* (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願2001-16626(P2001-16626)

(22) 出願日 平成13年1月25日 (2001.1.25)

(71) 出願人 000006792

理化学研究所
埼玉県和光市広沢2番1号

(71) 出願人 599019111

大野 忠夫
茨城県牛久市中央1丁目18番地12

(71) 出願人 000002141

住友ベークライト株式会社
東京都品川区東品川2丁目5番8号

(72) 発明者 大野 忠夫

茨城県牛久市中央1-18-12

(74) 代理人 100068700

弁理士 有賀 三幸 (外6名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞培養容器

(57) 【要約】

【課題】 動物細胞培養用96ウェルプレートのような多数の培養用ウェルを持つ容器で培養された状態でも、培養液交換に当たって、浮遊細胞であっても簡単には除去されにくく、また、足場依存性付着細胞の凍結、融解後も簡単には浮遊状態にさせず、細胞機能を速やかに回復できる状態にした細胞培養容器を提供すること。

【解決手段】 培養細胞を、培養液が通過できる多孔性構造により培養容器内に保持してなる細胞培養容器。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 培養細胞を、培養液が通過できる多孔性構造により培養容器内に保持してなる細胞培養容器。

【請求項2】 培養細胞が、凍結された培養細胞である請求項1記載の細胞培養容器。

【請求項3】 培養液が通過できる多孔性構造が、フィルター構造又は多孔質3次元構造である請求項1又は2記載の細胞培養容器。

【請求項4】 多孔性構造による細胞の保持が、フィルター構造若しくは多孔質3次元構造の内部、及び／又はフィルター構造若しくは多孔質3次元構造と容器底面との間に細胞が保持されているものである請求項1～3のいずれか1項記載の細胞培養容器。

【請求項5】 容器が、マルチウェルプレートである請求項1～4のいずれか1項記載の細胞培養容器。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は培養細胞を保持してなり、融解後の培養が容易な細胞培養容器に関する。

【0002】

【従来の技術】市販の細胞培養用96ウェルプレートは、化合物の細胞毒性試験等、各種の生物学的試験法に汎用されている。そのウェルの位置、大きさ等が標準化されていることもあって、全自動ロボットにも適用されており、大量に使用されている。この場合、96ウェルプレートで培養した浮遊性動物細胞はもちろん、足場依存性の付着細胞も広く利用されているものの、長期間に渡って前培養し準備してきた細胞を各試験ごとに96ウェルプレートに接種し、本試験に備えなければならないという煩雑さがある。もし、96ウェルプレートに予め播種し培養された状態のまま凍結保存可能ならば、都合の良いときに前培養を行い凍結保存しておいて、随時必要な時に融解し本試験に供することができ、格段に便利になると考えられる。

【0003】特許第1919397号においては、足場依存性動物細胞を培養基質上で付着培養した状態で凍結保存、融解再利用する方法が記載されている。しかし、この方法では融解して再利用する際、足場依存性動物細胞は剥離しやすくなり、融解後の培養液交換に当たって浮遊除去されてしまうという問題があった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、例えば動物細胞培養用96ウェルプレートのような多数の培養用ウェルを持つ容器で培養された状態でも、培養液交換に当たって、浮遊細胞であっても簡単には除去されにくく、また、足場依存性付着細胞の凍結、融解後も簡単には浮遊状態にさせず、細胞機能を速やかに回復できる状態にするのに適した細胞培養用容器を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】そこで本発明者は、培養細胞の培養液交換に当たっては、必ずしも完全に新鮮な培養液にする必要はなく、培養細胞にとって不都合でない程度に栄養成分等が新鮮培養液から供給されれば、培養細胞は健全な状態で継続的に培養可能であるという経験に基づき、培養液交換に当たって、浮遊細胞であれ足場依存性の付着細胞であれ、簡単には除去されないようにするためには、少なくとも細胞近傍の培養液の急激な流動状態から細胞が保護される多孔性構造物を作り、細胞が簡単には浮遊しない状態に保ちながら、培養液全体の大部分を交換できるようにすれば良いことを見出し、本発明を完成した。

【0006】すなわち、本発明は、培養細胞を、培養液が通過できる多孔性構造により培養容器内に保持してなる細胞培養容器を提供するものである。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明において、培養細胞を培養容器内に保持する多孔性構造としては、培養液が通過でき、かつ融解後に細胞が簡単に浮遊除去されないものであれば特に制限されないが、フィルター構造又は多孔質3次元構造であるのが好ましい。当該フィルター構造としては、紙性フィルター多孔性メンブレンフィルター、スポンジ状シート、不織繊維シート、織布シート等の穴の開いた落とし蓋状にできるフィルター構造が挙げられる。一方、多孔質3次元構造としては、多孔性メンブレンフィルター、スポンジ状物、繊維を詰め込んだ構造物、繊維を成型した構造物等が挙げられる。当該多孔性構造の孔径は、培養液が通過でき、細胞が簡単には浮遊除去されなければ細胞が通過できてもよく、特に制限されないが、0.1～1.0mmが好ましく、孔の形状は一定である必要はない。

【0008】さらに具体的には、例えば96ウェルプレートの場合、繊維状のものを円盤状に成型したNew Brunswick Scientific社製Fibro-Cel Diskを各ウェルに用いることができる。また、紙性フィルターや多孔性メンブレンフィルター等を細胞培養用容器の培養面のサイズに合わせて切り取り、それを細胞培養面上にはめて用いることができる。また、多孔質の素材よりなる3次元培養空間を細胞培養用容器の培養面に構築してもよい。

【0009】当該多孔質構造により培養容器内に細胞を保持させる手段は、その多孔質構造により異なるが、フィルター構造若しくは多孔質3次元構造の内部、及び／又はフィルター構造若しくは多孔質3次元構造と容器底面との間に細胞を保持させればよい。従って、例えば多孔質構造と容器の底面との間に細胞を保持するには、予め細胞を容器内で培養しておき、その培養面の上に穴の開いた落とし蓋状にできるフィルターをウェルに入れる、スポンジ状シートを細胞培養面の上にはめる、繊維を詰め込んだシートをはめる、布状シートをはめる等の操作を行えばよい。また、多孔質の素材によりなる3次

元培養空間を細胞培養容器の培養面に構築するため、例えばコラーゲン溶液をマルチウェルプレートの各ウェルに入れ凍結乾燥して、ウェル底面にコラーゲンによる多孔性3次元培養空間を作製してもよい。コラーゲン溶液に限らず多孔性空間を形成できる他の素材を用いてもよい。このような多孔性3次元培養空間を作製した場合、その上から細胞を播種して培養するのが好ましい。なお、前記のシートやフィルターを形成した後、その上から細胞を播種して培養してもよい。ただこの場合は、多孔性構造の孔径が播種する細胞より大きいものでなければならぬ。

【0010】本発明の細胞培養容器としては、マルチウェルプレート、すなわち一枚の板状のプレートに多数の穴を持つように成形したマルチウェルプレートを用いることができる。例えば、プラスチック製96ウェルプレート、48ウェルプレート、24ウェルプレート、12ウェルプレート等を用いることができるが、細胞培養が可能なものであればよく、必ずしもこれらに限定されるものではない。

【0011】本発明に用いられる細胞としては、足場依存性細胞でも浮遊性細胞でもよいが、足場依存性細胞、特に特公平5-77389号記載の足場依存性動物細胞が好ましい。

【0012】本発明細胞培養容器には、細胞が予め凍結されて保持されているので、当該凍結細胞を融解してそのまま細胞を培養に供することができる。本発明では、細胞培養容器中で培養された細胞に対し、培養液を交換する際、細胞が容易に浮遊して交換前の培養液とともに除去されないように、培養液が通過できる多孔性構造を仕づらえてある。これによって、培養液を交換する際、細胞近傍の培養液の急激な移動が起こらず、細胞が浮遊しにくい状態を保つことができる。

【0013】本発明の細胞培養容器を用いて凍結保存された培養細胞を融解し、再び生存状態に戻すときは、細胞内の水結晶の成長による細胞内構造破壊を防ぐため、極力短時間で、細胞の凍結保存温度から融解状態の温度にまで、一挙に温度を上げることが必要とされている。このために適した細胞培養用容器の一種類であるマルチウェルプレートに入っている状態で凍結されている細胞を融解する際には、各ウェルに温熱をほぼ均等にかつ急速に供給する必要がある。

【0014】細胞培養用容器である市販マルチウェルプレートには、基本的に2種類の構造を持つものがある。一つは、各ウェルともプレート底面から上に立ち上がっている構造でプレート底面が連続的に繋がっているもの（以下、これを煙突形プレートと称する）と、今一つは、各ウェルともプレート上面が連続的に繋がっているがそこからそれぞれ独立したウェルが下にぶら下がっている構造のもの（以下、これをバケツ形プレートと称する）である。本発明では、バケツ型プレートを使用する

のが好ましい。例えば塩化ビニル性96ウェルプレート（住友ベークライト製）等が挙げられる。ただし、熱伝導率が高く、熱容量も小さくすることが可能なプラスチック材料や、プラスチック以外でマルチウェルに成型可能な熱伝導率が高い材料を用いたプレートであれば、煙突形プレートを使用することもできる。

【0015】市販動物細胞培養用96ウェルプレート、例えばファルコン社製3072プレートは、その形態を強く丈夫に維持するためポリスチレンプラスチックの壁厚が大きい。それが熱容量が大きい理由である。そこで本発明では、ポリスチレンプラスチックの壁厚を薄くし熱容量を小さくしたマルチウェルプレートを用いることもできる。

【0016】また、本発明では、マルチウェルプレートにて培養した細胞を凍結融解する際、各ウェルに急速かつ均等に融解熱を供給するため、バケツ形プレートの各ウェルが個々に全部すっぽりはまる構造の穴を開けた加温ブロックを用いるのが好ましい。加温ブロックを形成する材料は例えばアルミニウムなどの熱伝導率の高い金属が望ましい。加温ブロックは、マルチウェルプレートに熱を加えることが目的であるので、必ずしもこの形状に限定されるものではなく、また加温ブロックのサイズにも制限はない。また、煙突形プレートを使用する場合は、プレート底面が全面密着できる加温ブロックや柔軟な保温剤を入れたバッグ等をプレートに密着させて用いることもできる。

【0017】加温ブロックはプレートの形状に密着させることが最も効果的ではあるが、そうした場合、解凍により発生した水滴などが加温ブロックとマルチウェルプレートの間に入り解凍終了後、加温ブロックとマルチウェルプレートが密着して外れなくなることがある。これを防ぐために、加温ブロックに開けた穴の側面に空気抜きのための溝を構築するのが好ましい。この溝はマルチウェルプレートを加温ブロックから外すときのみに必要であるので、大きいものである必要はなく0.2mm～1.0mm程度の深さの溝が最適であるが、これに限定されるものではない。また、溝の数は、各ウェルに1本が基本であるが、これに限定されるものではない。

【0018】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0019】（参考例1） マルチウェルプレートに入っている状態で凍結されている細胞を融解する際に、各ウェルに温熱をほぼ均等にかつ急速に供給する装置の作製。

バケツ型96ウェルプレートの各ウェルの外側が密着するウェルを持つアルミブロックを作製した。アルミブロックの各ウェルと、バケツ型96ウェルプレートの各ウェルがほぼ密着するが、出し入れが容易なようにアルミ

ブロックのウェル壁に細い空気抜き用溝を設置した。図1にその仕様を示す。この加温ブロックを予め37℃のインキュベーター中で十分加温しておけば、各ウェルに100μLの水を入れた塩化ビニル製96ウェルプレートに-80℃のフリーザーから取り出した直後にのせても、3分以内にすべてのウェル内の水を溶解できた。加温ブロックとしての実用性は十分である。

【0020】(実施例1) In situ凍結細胞プレキャスト培養プレートの作製

多孔質の基質の中で細胞を培養し、細胞を培養状態のまま(以下、in situの状態という)で凍結し(以下、凍結細胞プレキャスト状態という)、融解後の培養液交換時に、培養液の流れによるせん断力を加えられるチャンスが少なくなる容器を作製する。ここでは、付着細胞を培養状態のまま凍結し、融解後に速やかに使える状態の培養96ウェルプレートを作製、ロボットによる各種自動アッセイに供給できるようにする。

【0021】方法としては以下の通りである。

(1) 塩化ビニル製96ウェルプレート(住友ベークライト製、96ウェルプレート用蓋付き、)4枚の各ウェルに、滅菌したFibro-Cel Disk(New Brunswick Scientific社製)を各ウェルに1枚ずつ入れた。

(2) 各ウェルに100μLの培養液を添加し、37℃の炭酸ガスインキュベーター中で、1~2時間インキュベートした。培養液の種類は使用する細胞種に対応して選択した。HepG2の細胞の場合はダルベッコ改良MEM培地にウシ胎児血清を10%添加したものであり、HeLa S3(SC)細胞の場合はMEM培地に仔ウシ血清を10%添加したものである。

(3) この上から、100μLの培養液に懸濁したHepG2細胞又は、HeLa S3(SC)細胞を各ウェルに 1×10^5 個ずつ播種し、37℃の炭酸ガスインキュベーター中で培養した。細胞種ごとに2枚の96ウェルプレートの1枚を使用した。

(4) 翌日、細胞種ごとに96ウェルプレートの1枚をとり、(8)のステップに進み、細胞数を定量した。

(5) 残りの96ウェルプレートの各ウェルから150μLの培養液を除去、50μLの凍結用培地FM-1(極東製薬工業(株)製)を添加し、凍結専用の発泡スチロール箱(Ohno, T. et al., Cytotechnol. 5, 273-277, 1991.)に入れ、-80℃のフリーザーに入れ凍結した。

(6) さらにその2日後、96ウェルにちょうど対応したバケツ型の孔を明けておいたアルミブロック(参考例1参照)を予め37℃に十分加温しておいて、-80℃のフリーザーから取り出したプレートを即刻乗せ、凍結細胞を融解した。融解時間はHepG2では3分間、HeLa S3(SC)では2分間とした。

(7) 各ウェルの凍結保存用培養液を自動分注ロボット(Biomek-1000, Beckman社製)で50μL除去し、これ

に新鮮な通常培養液150μLを添加した。

(8) 各ウェルの培養液を自動分注ロボットで150μL除去し、これに新鮮な通常培養液150μLを添加した。こうして各ウェルの培養液を交換後、生存細胞数をWST-8法により定量した。試薬のWST-8は生化学工業(株)から入手し、生存細胞数の定量は同社のマニュアルに従った。生存細胞数は450nmの吸光度に比例するため、結果は450nmの吸光度で表した。細胞が全く入っていないウェルのこの値をブランク値とした。

(9) 凍結前の96ウェルプレートの各ウェルの吸光度からブランク値を引いた値の平均値をAとし、凍結融解後の96ウェルプレートの各ウェルの吸光度からブランク値を引いた値をBとして、次式で生存率(%)を算出した。

【0022】(数1)

$$\text{生存率}(\%) = (B/A) \times 100$$

【0023】結果は、表1に示すように、HepG2細胞の場合は平均値±標準偏差が $71.3 \pm 12.0\%$ となった。凍結融解直後のプレート全体としては十分な生存率である。数値の入っていないウェルはテストに使用しなかったウェルである。平均値より低いウェルをグレーに色分けすると、プレート全体では、やや左下部分の生存率が悪い。しかし、特に特定のウェルの列・行に大きな隔たりはなかった。

【0024】また、表2に示すように、HeLa S3(SC)細胞の場合は平均値±標準偏差が $80.9\% \pm 17.8\%$ となった。これも凍結融解直後のプレート全体としては十分な生存率である。数値の入っていないウェルはテストしていなかったウェルである。この場合も、特に特定のウェルの列・行に大きな偏りはなかった。

【0025】これらの結果は、各ウェルを見ると細胞の生存率バラツキがあるが、複数のウェルを組み合わせれば細胞の生存率の平均値に大きな差がなくなること示している。実際に、各行・各列の平均値を取ると、その行間・列間の相互の差は少なくなった(表1, 2)。

【0026】また、従来は、足場依存性動物細胞は凍結融解後に剥離しやすくなり、融解後の培養液交換に当たって浮遊除去されてしまうという問題があったが、これらの結果は、Fibro-Cel Diskを各ウェルに入れたことによって、ほとんどの細胞は残存しており、大量に浮遊除去される心配はない状態であることを示している。従って、プレート全体としてみれば生存率も実用性のある高さであり、培養細胞を使った各種のアッセイにとっても、複数のウェルを組み合わせればほぼ均一な生存率となり、凍結融解後に速やかに使える状態にあって、ロボットによる各種自動アッセイに十分供給できるものであることを示している。

【0027】

【表1】

HepG2細胞の凍結解凍後の生存率

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	91.44	66.89	81.58	85.87	92.84	83.19	99.48	88.01	88.23	87.26	69.36	93.91
B	70.33	67.43	83.94	81.69	70.54	82.76	90.37	77.08	70.11	77.62	84.80	84.80
C	85.55	74.93	86.51	79.01	79.12	73.97	89.62	80.08	94.98	87.69	87.69	85.55
D	78.47	65.72	71.72	62.93	71.18	63.57	81.05	70.43	80.72	73.54	83.51	81.47
E	73.01	74.72	71.93	58.64	73.22	67.54	78.47	73.11	63.46	53.82	84.48	68.82
F	70.00	80.94	84.75	69.79	51.99	48.67	77.83	69.79	75.90	79.54	84.05	79.87
G	71.72	68.93	69.04	64.97	79.97	68.07	79.97	69.04	85.55	79.44	67.97	61.32
H	76.65	83.83	54.24	61.43	76.22	60.78	89.30	76.22	83.62	72.47	78.47	82.12

平均値	76.18979
標準偏差	9.953009

【0028】

【表2】

HeLa S3細胞の凍結解凍後の生存率

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	88.68	101.95	83.03	69.89	88.57	88.92	111.98	91.11	122.13	84.42		55.82
B	85.11	83.26	72.42	84.19	96.76	89.38	107.25	93.18	73.69	69.66	89.26	74.73
C		96.99	74.04		91.57	66.77	71.96	106.44	111.63	122.94		71.96
D	91.11	90.99	71.62	61.58	70.46	68.27	90.07	94.8	67.35	74.04	63.31	113.71
E	75.77	74.85	87.53	98.14	93.76	65.39	93.41	92.95	84.42	77.84	88.39	64.47
F	93.53	83.15	68.04	75.65	96.76	76.92	111.75	61.35	95.72	80.61	52.7	96.76
G	89.49	80.84	93.41	82.34	104.95	73.46	95.14	73.58	97.33	75.77	70	69.43
H	84.65	84.42	103.22	84.65	85.8	93.18	73.69	84.99	86.03	78.19	58.82	90.3

平均値	84.3537
標準偏差	14.5381

【0029】

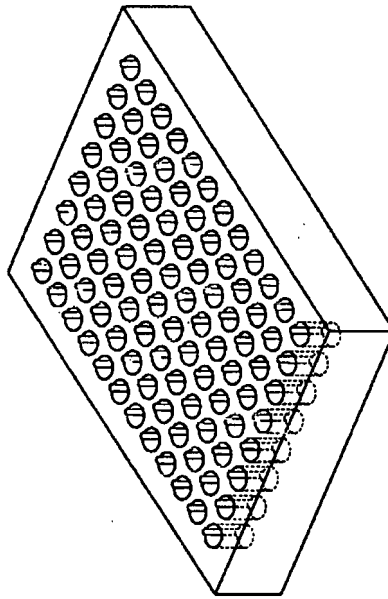
【発明の効果】細胞培養用96ウェルプレートで培養された状態でも、培養液交換に当たって、浮遊細胞であっても簡単には除去されにくく、また、足場依存性付着細胞の凍結、融解後も簡単には浮遊状態にさせず、細胞機能を速やかに回復できる状態にした細胞を提供すること

ができ、ロボットによる各種自動アッセイに十分使用できるものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】マルチウェルプレート各ウェル用加温ブロックの概略図である。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 河村 健司

秋田県秋田市土崎港相染町字中島下27-4

秋田住友ベーク株式会社内